ORSAY
Série A. N°
N° D'ordre 3

284

Etude de la stimulation par l'insuline du métabolisme du diaphragme en survie: transport et métabolisme du glucose, biosynthèse des protéines, renouvellement des nucléotides; leurs corrélations.

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles,
enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro: A.O. 1.457.

EBOUE-BONIS Dominique

Soutenue le 10 juillet 1967 à la FACULTE DES SCIENCES d'ORSAY

devant le Jury:

MM. LEDERER, Président
CLAUSER
MOREL
Mme GRUNBERG-MANAGO

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE BIOLOGIQUE.
Extrait du Tome 49, n° 4, 1967, p. 415.

Printed in France.

ACTION SÉLECTIVE DE LA N-ÉTHYLMALÉIMIDE SUR LA STIMULATION PAR L'INSULINE DU MÉTABOLISME DU DIAPHRAGME EN SURVIE (*),

par D. Eboue-Bonis, A. M. Chambaut, P. Volfin et H. Clauser.

Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay (Essonne) France.

(Mémoire reçu le 8 novembre 1966).

Résumé. — 1) L'inhibition sélective de différentes actions de l'insuline a été étudiée sur le diaphragme isolé de rat après de brèves préincubations avec la N-Ethylmaléimide (NEM $10^{-3} \times$ M). Dans ces conditions, il est possible de supprimer spécifiquement l'action de l'insuline sur le transport du glucose et du galactose.

2) Malgré cette inhibition, la stimulation de la biosynthèse du glycogène par l'insuline peut toujours être observée et la conversion de la forme D en forme I de la glycogène synthétase n'est pas modifiée.

3) L'incorporation de ^{32}P-phosphate minéral dans les mononucléotides libres et la phosphocréatine n'est pas inhibée par de brèves préincubations avec la NEM. La stimulation de cette incorporation par l'insuline n'est pas modifiée dans ces conditions.

4) Il est conclu que la stimulation par l'insuline du transport des sucres à travers la membrane cellulaire n'est pas une condition nécessaire à l'action de cette hormone sur d'autres phénomènes métaboliques. D'autre part, l'hypothèse d'une réaction primaire entre un pont disulfure de l'insuline et un groupe —SH du récepteur cellulaire est discutée.

Les expériences concernant le mécanisme de l'action de l'insuline sur le métabolisme de tissus en survie ont été ces dernières années interprétées suivant deux séries d'hypothèses. D'une part, il a été tenté d'en tenir compte en les attribuant à des interactions entre l'hormone et la membrane cellulaire, interactions qui aboutiraient notamment à une

(*) Le présent travail dont certains résultats ont fait l'objet de communications préliminaires [1, 2] fait intégralement partie d'une thèse de Doctorat ès-sciences qui doit être présentée par l'un des auteurs (D. E-B). Les travaux exposés dans les publications 14 et 30 sont également inclus dans cette thèse de Doctorat.

Abréviations :

NEM : N-ethylmaléïmide.
UDPG : Uridine diphosphate glucose.
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique.
TCA : acide trichloroacétique.
ATP, ADP : adénosine tri- et di-phosphate.

Les animaux sont fournis par le Centre de Sélection des animaux de Laboratoire à Gif (Essonne) et par l'Elevage de Sargé (Sarthe).

pénétration accrue des sucres [3-6], des acides aminés [7-9], du phosphate minéral [10, 11] de certains ions [12]. D'autre part, l'on a envisagé la biosynthèse induite de certains enzymes sous l'action de l'hormone qui agirait en quelque sorte comme un dérépresseur de l'information génétique [13]. Il semble qu'à l'heure actuelle, aucune des explications données ne puisse rendre compte de la totalité des phénomènes observés sous l'action de l'insuline. Il est notamment apparu que l'hypothèse d'une dérépression ne pouvait être maintenue [14-17] puisque l'inhibition presque totale de la biosynthèse de l'ARN sous l'action de l'actinomycine D laisse intactes les autres stimulations insuliniques. Il en est de même lorsque la biosynthèse des protéines est inhibée par la puromycine. Quant à la première hypothèse, elle a abouti à postuler une réaction d'échange disulfure-sulfhydrile entre l'insuline et une protéine membranaire hypothétique en tant que réaction primaire hormone-tissu récepteur [18-20]. Cette hypothèse est principalement fondée sur l'action des inhibiteurs des groupes -SH, tels que la NEM, vis-à-vis de différentes actions insuliniques.

Dans le présent travail, une étude systématique de l'action de la NEM pendant des temps de préincubation très brefs a été entreprise sur le diaphragme isolé de rat, afin d'évaluer les corrélations entre trois séries de phénomènes : pénétration du glucose et du galactose dans le diaphragme isolé, stimulation de la biosynthèse du glycogène, stimulation de l'incorporation de phosphate minéral radioactif (^{32}Pi) dans les mononucléotides et la phosphocréatine.

Matériel et méthodes.

Réactifs.

Insuline de bœuf, échantillon cristallisé (Laboratoires Choay, Paris) — N-éthylmaléïmide et D(+) glycogène (Fluka) — D(+)-glucose et D(+)-galactose (Hofmann La Roche, Paris) — Sérumalbumine bovine, fraction V du plasma (Armour Pharmaceutical Company) — Glucose-6-phosphate, sel de sodium (Boehringer et Soehne) — Uridine diphosphate glucose, sel de sodium (P-L. Biochemicals Inc. Wisconsin) — D(+)-[$^{14}C_6$]-glucose (C.E.A., Saclay) — D(+)-[1-^{14}C]galactose (The Radiochemical Center, Amersham, Angleterre) [^{14}C-*glucose*]-UDPG (Laboratoires I.C.N., Californie) (*) — Phosphate radioactif, NaH_2 $^{32}PO_4$ du C.E.A. (Saclay).

La radioactivité est mesurée avec un compteur Nuclear Chicago 4313. Au cours des expériences de double marquage, ^{32}P et ^{14}C ont été comptés à l'aide d'un compteur à scintillation Packard Tri-Carb.

Animaux.

Des rats femelles de souche Wistar (100-150 g) sont mis à jeun 20 heures avant l'expérience. Ils sont tués par décapitation.

(*) Nous remercions également Monsieur le Professeur R. Dedonder qui a mis à notre disposition un lot de [^{14}C-glucose]-UDPG.

Incubation des diaphragmes.

Les diaphragmes sont préincubés pendant 5 minutes dans du tampon Krebs Ringer bicarbonate contenant du glucose (2 mg/ml), à 37° et sous une atmosphère de 95 p. 100 O_2 + 5 p. 100 CO_2 (pH 7,4). La NEM est ensuite ajoutée aux concentrations indiquées. Après des temps variables les diaphragmes sont retirés, la NEM en excès est éliminée par deux lavages successifs dans un tampon frais. Les diaphragmes témoins sont soumis au même traitement mais sans addition de NEM.

Chaque diaphragme est ensuite incubé dans du tampon Krebs Ringer bicarbonate contenant de la sérumalbumine (0,5 mg/ml) et éventuellement du glucose (2 mg/ml), des produits radioactifs ([$^{14}C_6$]glucose ou [1-^{14}C]galactose, ou [^{32}P]phosphate) ou [$^{14}C_6$]glucose + [^{32}P]phosphate) et de l'insuline (10 µg/ml) (*).

Pénétration des sucres.

Elle est estimée soit d'après la consommation du glucose, déterminée par la disparition de ce sucre du milieu d'incubation (dosage par la méthode de Somogyi [21]), soit par la mesure de l'incorporation du [$^{14}C_6$]-glucose ou du [^{14}C]-galactose dans le tissu. Dans certaines expériences, le diaphragme est broyé dans 10 ml d'acide trichloroacétique à 10 p. 100 à l'aide d'un broyeur Virtis « 45 », la radioactivité est comptée sur une fraction du surnageant. Dans d'autres cas, le diaphragme est traité par 1 ml de potasse à 30 p. 100 pendant 30 minutes à 100° et la radioactivité déterminée sur une partie de l'extrait après neutralisation par de l'acide chlorhydrique.

Extraction et dosage du glycogène.

Le diaphragme est traité par 1 ml de potasse à 30 p. 100 pendant 30 minutes. Le glycogène est précipité par addition de 2,5 volumes d'éthanol à 95 p. 100 pendant une nuit, à 0° ; il est ensuite purifié par solubilisation dans de l'acide trichloroacétique à 5 p. 100 et reprécipitation par de l'éthanol. Le précipité est lavé deux fois avec de l'éthanol à 70 p. 100, une fois avec de l'éthanol absolu. Le dosage est effectué après hydrolyse du glycogène par HCl 2N à 100° et pendant 2 heures, suivant la méthode de Somogyi [21]. Le rendement de cette méthode, déterminé sur un échantillon témoin de glycogène est de 95 p. 100.

Estimation de la biosynthèse du glycogène.

Le glycogène marqué (à partir de [$^{14}C_6$]glucose) est isolé suivant la méthode décrite. La radioactivité d'une fraction de l'hydrolysat est comptée. La quantité de glycogène synthétisé est estimée d'après la radioactivité incorporée dans le glycogène que l'on a isolé ; elle est calculée en tenant compte de la radioactivité spécifique du milieu d'incubation. Il n'a pas été possible de tenir compte du glycogène éventuellement dégradé par phosphorolyse au cours de l'incubation.

(*) Au cours de ce travail, les incubations en présence d'insuline ont toujours été effectuées avec une quantité fixe d'hormone produisant les effets maximum. Les relations dose/effet à des concentrations physiologiques d'insuline ont fait l'objet de travaux antérieurs [1, 42].

Activité de l'UDP-glucose : α-1,4-glucane α-4-glucosyltransférase (glycogène-synthétase).

La mesure de cette activité est effectuée d'après la technique de VILLAR-PALASI et LARNER [22].

Les diaphragmes incubés sont conservés de 1 à 2 heures à — 15°, puis broyés dans du tampon tris-maléate 0,05 M -EDTA 0,0025 M (pH 8,2 ou 7,0) à l'aide d'un Turax à 0°.

L'homogénéisat est centrifugé à 20 000 g pendant 30 minutes et à 0°. 0,1 ml du surnageant (correspondant à environ 5 mg de tissu) est incubé dans du tampon tris-maléate 0,05 M - EDTA 0,0025 M (pH 8,2 ou 7,0) contenant du glycogène (1 mg), de l'UDPG (0,6 µmole) de l'UDP[^{14}C]glucose (33 ou 66 mµc), en présence ou non de glucose-6-phosphate (5,85 µmoles), dans un volume final de 0,2 ml, à 30° pendant 10 ou 20 minutes. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de TCA à 5 p. 100. La radioactivité totale est comptée sur une partie du surnageant (des essais ont montré que toute la radioactivité se trouvait dans cette fraction). Le glycogène est précipité et extrait à partir d'une autre fraction du surnageant suivant la méthode décrite.

L'influence directe de la NEM sur l'activité de la glycogène synthétase a été étudiée en incubant des extraits de tissu en présence de NEM aux concentrations suivantes : 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-5} M. Une concentration de 10^{-7} M pourrait en effet être présente lors de l'incubation d'extraits de diaphragmes prétraités par de la NEM.

Aucune action n'a été trouvée, aussi bien en absence qu'en présence de glucose-6-phosphate.

Teneur et radioactivité spécifique de la phosphocréatine et des nucléotides.

L'incubation des diaphragmes, l'estimation de la teneur et de la radioactivité spécifique de la phosphocréatine et les calculs de l'activité spécifique des différents nucléotides ont été effectués comme il a été précédemment décrit [23]. La séparation chromatographique des nucléotides a été également décrite dans des publications précédentes [24-25].

Expériences simultanées d'incorporation du [$^{14}C_6$]glucose et du [^{32}P]-phosphate.

Dans le cas d'une étude simultanée de la consommation de [$^{14}C_6$]glucose par le diaphragme et de l'incorporation du [^{32}P]phosphate dans les nucléotides deux méthodes ont été employées :

Dans le premier cas, les incorporations des deux substrats marqués ont été étudiées séparément sur des hémidiaphragmes croisés provenant des mêmes animaux après prétraitement des diaphragmes entiers au moyen de NEM, d'après la méthode décrite ci-dessus. Le temps d'incubation en présence de [^{32}P]phosphate a été de 10 minutes, celui en présence de [$^{14}C_6$]glucose de 20 minutes, le temps *total* d'incubation étant de 20 minutes pour tous les diaphragmes.

Dans le second cas une expérience de « double marquage » a été effectuée par addition successive des deux substrats à un même diaphragme,

de sorte que les temps d'incubations respectifs en présence de l'un ou l'autre substrat soient identiques à ceux du paragraphe précédent. Les comptages ont été effectués à l'aide d'un compteur à scintillation Packard Tri-Carb avec des gains de 0,1 p. 100 (^{32}P) et de 10 p. 100 ($^{32}P + {}^{14}C$), le marquage dû au ^{14}C étant déterminé par différence, compte tenu des corrections habituelles.

Résultats.

Action de la NEM sur la pénétration du glucose et du galactose dans le diaphragme isolé.

L'action inhibitrice d'une préincubation de courte durée avec la NEM sur la stimulation par l'insuline de la consommation de glucose par le muscle isolé est confirmée dans le présent travail pour des incubations de une ou deux heures (Tableau I).

Tableau I.

Action de la NEM sur la consommation de glucose par le diaphragme de rat incubé en absence ou en présence d'insuline.

Insuline : 10 µg/ml.....	0	+	0	+
NEM : $10^{-3} \times$ M (80 sec.) ..	0	0	+	+
Durée de l'incubation :				
1 heure.....	2,89 ± 0,10	7,80 ± 0,72	3,08 ± 0,36	4,20 ± 0,24
Nombre d'expériences ..	3	3	3	3
Durée de l'incubation :				
2 heures	1,42 ± 0,09	5,03 ± 0,52	2,16 ± 0,07	2,93 ± 0,20
Nombre d'expériences ..	3	3	4	4

Les consommations sont exprimées en mg de glucose/g poids frais/heure d'incubation, ± l'erreur standard sur la moyenne.

Des expériences additionnelles démontrent que cette inhibition peut également être mise en évidence pour des temps d'incubation relativement courts (10 et 20 minutes) lorsque le glucose radioactif [$^{14}C_6$]glucose, est utilisé comme substrat (Figure 1).

Malgré le fait que le système transporteur du galactose ne semble pas être identique au système transporteur du glucose [26], la NEM inhibe dans les mêmes conditions expérimentales l'effet de l'insuline sur la pénétration du [1-^{14}C]galactose dans la cellule (Figure 2), mais le phénomène est un peu moins marqué. Cependant, il faut noter que dans l'expression des résultats concernant le galactose il n'a pas été tenu compte des données de Battaglia et Randle [26] qui indiquent que l'insuline diminue l'espace extracellulaire en présence de galactose alors que la NEM inhibe cette diminution. S'il était tenu compte de ces espaces extracellulaires,

l'inhibition de la pénétration du galactose par la NEM serait beaucoup plus spectaculaire qu'il n'apparaît sur la Figure 2.

La figure 3 montre que l'inhibition de l'action de l'insuline sur la pénétration du glucose radioactif par la NEM 10^{-3} x M est déjà nette après une préincubation de 50 secondes et devient presque totale après une préincubation de 80 secondes.

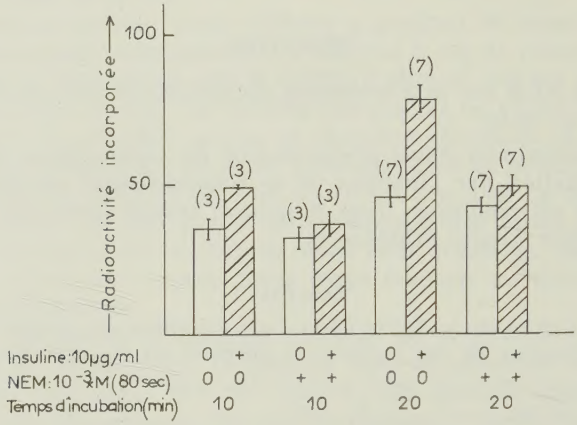

FIG. 1. — *Action de l'insuline et de la NEM sur l'incorporation de [$^{14}C_6$]glucose dans le diaphragme isolé de rat.*

La radioactivité incorporée est estimée sur l'extrait trichloroacétique du diaphragme ; elle est exprimée en

$$\frac{\text{coups/minutes/100 mg de tissu}}{\text{coups/minutes/100 g de milieu extracellulaire}} \times 100$$

Les temps de préincubation employés au cours de ce travail sont beaucoup plus courts que ceux utilisés par MIRSKY et PERISUTTI sur le tissu adipeux [19] et par CARLIN et HECHTER sur le diaphragme [20]. Le temps de préincubation utilisé par CADENAS *et al.* [18] sur le cœur perfusé est inférieur ou égal à 30 secondes.

Action de la NEM sur la biosynthèse du glycogène.

Le Tableau II montre que, dans des conditions expérimentales identiques à celles des figures 1 et 2, la quantité de glycogène synthétisé sous l'action de l'insuline par le diaphragme isolé est fortement diminuée quand le muscle est préincubé avec de la NEM. Cependant, une évaluation du rapport entre le glycogène synthétisé et le glucose consommé indique que l'inhibition par la NEM serait entièrement due à l'inhibition de la pénétration du glucose extracellulaire. En effet, l'insuline stimule sélectivement la voie métabolique qui mène du glucose au glycogène et cette stimulation est du même ordre que le diaphragme ait été prétraité par la NEM ou non. Cette stimulation pourrait être expliquée par la conversion, sous l'action de l'insuline, de la glycogène synthétase D en glycogène synthétase I [22]. Les résultats exposés dans le Tableau II permettent de supposer que cette interconversion n'est pas inhibée par la NEM.

La stimulation spécifique de cette voie métabolique par l'insuline apparaît encore plus nettement lorsque l'on compare les résultats obtenus avec

TABLEAU II.

Action de l'insuline et de la NEM sur la pénétration du glucose et la biosynthèse du glycogène dans le diaphragme isolé de rat.

Insuline : 10 µg/ml	0	+	0	+	0	0
NEM : 10^{-3} × M (80 sec.).....	0	0	+	+	0	+
Glucose (mg/ml)	2	2	2	2	5	5
Nombre d'expériences	3	3	3	3	2	2
Consommation de glucose (mg/g/h)	2,65 ± 0,45	7,83 ± 0,62	2,63 ± 0,20	3,62 ± 0,43	4,82 ± 0,98	5,00 ± 0,55
Glycogène synthétisé (mg/g/h)	1,77 ± 0,13	6,73 ± 0,53	1,14 ± 0,08	2,76 ± 0,45	3,07 ± 0,68	2,07 ± 0,13
Glycogène synthétisé / Glucose consommé × 100	70 ± 8,5	86 ± 5,3	44 ± 4,1	75 ± 3,4	64 ± 2,0	42 ± 6,0

La consommation du glucose est calculée d'après la radioactivité totale qui a pénétré dans le tissu (espace extracellulaire déduit) en tenant compte de la radioactivité spécifique du milieu d'incubation. Les résultats sont suivis de l'erreur standard sur la moyenne.

l'insuline et les résultats du même tableau dans lesquels une consommation accrue du glucose a été provoquée par l'augmentation de la concentration du glucose extracellulaire (5 mg/ml) ; dans ce cas, la NEM n'inhibe

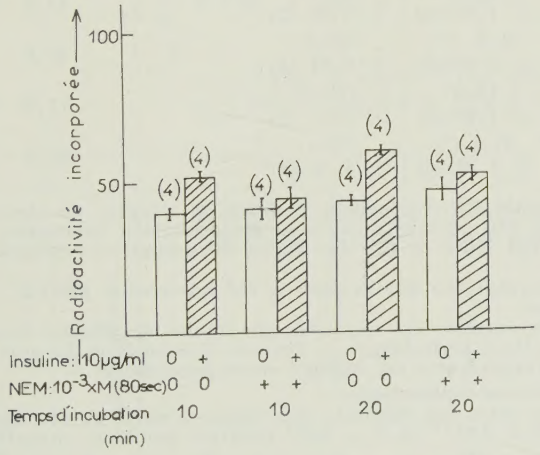

FIG. 2. — *Action de l'insuline et de la NEM sur l'incorporation de [1-¹⁴C]galactose dans le diaphragme isolé de rat.*

La radioactivité incorporée est estimée sur l'extrait trichloroacétique du diaphragme ; elle est exprimée en

$$\frac{\text{coups/minutes/100 mg de tissu}}{\text{coups/minutes/100 mg de milieu extracellulaire}} \times 100$$

pas le transport du glucose, et le pourcentage de glycogène synthétisé par rapport au glucose consommé, en absence ou en présence de NEM, est identique à celui du témoin pour lequel la concentration extracellulaire du glucose était 2 mg/ml.

Les résultats du Tableau III montrent en effet que le rapport entre la forme I et la forme D de la glycogène synthétase n'est pas modifiée par des préincubations avec la NEM, lorsque les diaphragmes sont ensuite incubés en présence d'insuline. En absence d'insuline, ce rapport paraît légèrement stimulé par le traitement à la NEM, de sorte que l'effet propre de l'insuline est un peu moins marqué dans le cas des diaphragmes traités à la NEM. De toute façon, il n'y a jamais d'inhibition de la glycogène synthétase. Des expériences, dont le détail n'est pas rapporté ici, ont montré qu'il en était de même lorsque l'évaluation de l'activité enzymatique était faite sur l'homogénéisat total du tissu, avant centrifugation à 20 000 x g.

TABLEAU III.

Activité de la glycogène-synthétase du diaphragme : action de l'insuline et de la NEM.

Traitement des diaphragmes		Incubation des extraits		Activité sans G-6-P (Forme I) / Activité avec G-6-P (Activité totale) × 100
insuline	NEM	sans G-6-P[a]	avec G-6-P	
0	0	14,8 ± 1,69 (5)	97,1 ± 8,76 (5)	15,2
+	0	21,6 (**) ± 2,03 (5)	83,7 ± 6,61 (5)	25,8
0	+	18,0 ± 1,60 (6)	103,0 ± 5,47 (5)	17,5
+	+	21,1 (*) ± 1,38 (6)	89,4 ± 5,32 (6)	23,6

Les diaphragmes ont été incubés pendant 20 minutes en absence ou en présence d'insuline (10 µg/ml), après une préincubation éventuelle de 80 sec. en présence de NEM (10^{-3} × M). Le milieu d'incubation contient du glucose : 2 mg/ml.

L'activité enzymatique des extraits a été mesurée à pH 8,2 ; l'incubation a duré 10 minutes.

L'activité enzymatique est exprimée en µmoles de glucose incorporé dans le glycogène/g de tissu frais/heure. ± l'erreur standard sur la moyenne.

Le nombre d'expériences est indiqué entre parenthèses.

(a) G-6-P : glucose-6-phosphate.

La différence entre les résultats des lignes 2 et 1, et des lignes 4 et 3 est significative : $P \# 0{,}01^{**}$ ou $P < 0{,}05^{*}$ (analyse par blocs casualisés).

Action de la NEM sur l'incorporation de [^{32}P]phosphate dans les mononucléotides et la phosphocréatine.

Dans une série d'expériences préliminaires (Tableau IV), il a été établi que la teneur du diaphragme en mononucléotides ainsi que l'incorpo-

TABLEAU IV.

Influence des conditions de préincubation en présence de NEM sur la teneur du diaphragme isolé en phosphocréatine et en nucléotides et sur la vitesse d'incorporation de [^{32}P]phosphate dans ces composés, en absence et en présence d'insuline.

Insuline : 10 µg/ml			0	+	0	+	0	+	0	+
NEM			0	0	+	+	0	0	+	+
Concentration (N.E.M.)	Durée de la préincubation		µg P/100 mg poids frais				Radioactivité spécifique			
1.10^{-3} × M	90 sec.	P. M. i	33,6	32,5	40,5	35,3	9,7	8,5	12,3	11,2
		P. C.	12,4	18,0	4,4	7,2	32	45	28	22
		ATP	26,5	29,2	7,9	12,2	33	46	20	16
		ADP	5,4	4,9	3,5	4,9	16	24	7	6
		U + G	2,4	2,1	0,8	1,2	28	46	15	13
1.10^{-3} × M	130 sec.	P. M. i	31,3	35,3	35,0	38,0	5,9	5,6	6,6	6,6
		P. C.	26,1	14,7	9,7	6,4	31	55	28	42
		ATP	26,4	17,4	11,1	7,9	38	66	31	37
		ADP	9,0	6,6	5,8	5,1	12	34	10	18
		U + G	3,0	5,8	2,1	1,7	23	42	16	29
10.10^{-3} × M	50 sec.	P. M. i	33,7	33,6	35,1	34,3	5,4	5,0	8,8	10,1
		P. C.	25,8	20,1	12,5	10,8	31	49	21	20
		ATP	20,5	18,1	2,0	5,7	41	—	16	10
		ADP	5,4	5,4	1,2	3,5	16	27	17	24
		U + G	2,8	2,2	2,4	2,7	34	48	27	25

P.M.i : phosphate minéral intracellulaire ; P.C. : phosphocréatine ; U + G : somme des nucléotides uridyliques et guanyliques.

La préincubation et l'incubation sont faites en l'absence de glucose.

L'incubation a duré 20 minutes : 10 minutes + 10 minutes en présence de [^{32}P]phosphate.

La radioactivité spécifique (coups/min/µgP) du P.M. intracellulaire est exprimée en p. 100 de celle du P.M. extracellulaire. Celle des autres composés est exprimée en p. 100 de la radioactivité spécifique du P.M. intracellulaire.

ration de phosphate inorganique ^{32}Pi dans ces composés étaient sensibles à une préincubation en présence de NEM : lorsque la durée de la préincubation atteint ou dépasse 90 secondes, ou lorsque la concentration de NEM dans le milieu est élevée (supérieure à 10^{-3} x M), ces teneurs diminuent pour atteindre à la limite des valeurs insignifiantes et l'action de l'insuline sur l'incorporation de phosphate minéral dans ces composés est supprimée.

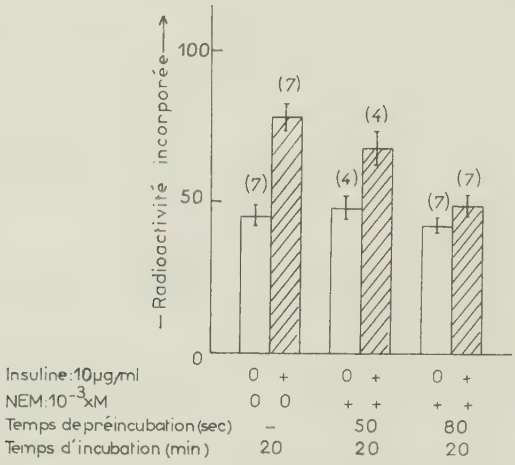

FIG. 3. — *Action de la NEM sur l'incorporation de [$^{14}C_6$]glucose dans le diaphragme isolé de rat : influence de la durée du traitement.*

La radioactivité incorporée est estimée sur l'extrait trichloroacétique du diaphragme ; elle est exprimée en

$$\frac{\text{coups/minutes/100 mg de tissu}}{\text{coups/minutes/100 mg de milieu extracellulaire}} \times 100$$

Cependant, pour des temps de préincubation plus courts (inférieurs ou égaux à 80 secondes) et lorsque la concentration de NEM ne dépasse pas 10^{-3} x M, les taux de nucléotides et de phosphocréatine restent constants et l'action de l'insuline n'est pas supprimée (Tableau V). Il faut noter également que la présence de glucose dans le milieu de préincubation semble dans une certaine mesure protéger l'intégrité du métabolisme du muscle contre l'action de la NEM.

Lorsque les conditions de préincubation sont rigoureusement contrôlées (NEM : 10^{-3} x M, durée : 80 secondes, glucose : 2 mg/ml), aucune inhibition de l'action insulinique sur l'incorporation de [^{32}P]phosphate dans les mononucléotides et la phosphocréatine des hémidiaphragmes ne peut être mise en évidence alors que les déterminations de la pénétration du glucose dans les hémidiaphragmes correspondants croisés provenant des mêmes animaux montrent une inhibition de l'action de l'hormone sur ce phénomène (Tableau V).

Ces résultats, obtenus avec des diaphragmes croisés, ont été confirmés par la technique du « double marquage » qui permet de déterminer sur

TABLEAU V.

Action de la NEM et de l'insuline sur la pénétration de [$^{14}C_6$]glucose, sur les taux en phosphocréatine et en nucléotides du diaphragme et l'incorporation de [^{32}P]phosphate dans ces composés (hémidiaphragmes croisés).

roupe	I	II	III	IV	I	II	III	IV
suline : 10 µg/ml	0	+	0	+	0	+	0	+
EM : 10^{-3} × M (80 sec.)	0	0	+	+	0	0	+	+
	µg P/100 mg poids frais				Radioactivité spécifique (*)			
M. i	32,7 ± 0,2	35,5 ± 0,2	37,3 ± 0,2	36,2 ± 0,2	6,7 ± 0,8	5,9 ± 0,4	5,9 ± 0,9	5,5 ± 0,3
C.	18,3 ± 0,2	16,4 ± 0,2	17,3 ± 0,1	19,6 ± 0,1	40 ± 3,4	59 ± 4,7	34 ± 4,8	50 ± 2,9
TP	28,4 ± 4,6	23,7 ± 1,3	24,3 ± 2,3	23,1 ± 1,0	53 ± 4,7	72 ± 7,4	39 ± 7,8	67 ± 10,4
DP	7,6 ± 1,4	6,7 ± 1,6	6,9 ± 0,8	6,9 ± 1,6	20 ± 2,3	32 ± 2,6	17 ± 2,2	23 ± 2,0
+ G	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2	27 ± 2,7	47 ± 4,5	24 ± 3,4	36 ± 5,0
					Pénétration du [$^{14}C_6$] glucose (*)			
					40 ± 2,4	68 ± 5,1	37 ± 1,8	43 ± 4,2

P.M.i : phosphate minéral intracellulaire ; P.C. : phosphocréatine ; U + G : somme des nucléotides uridyliques et guanyliques.

Le milieu d'incubation contient du glucose (2 mg/ml).

L'incubation a duré 20 minutes : 20 minutes en présence de [$^{14}C_6$]glucose ou 10 minutes + 10 minutes en présence de [^{32}P]phosphate.

La radioactivité spécifique du P.M. intracellulaire est exprimée en p. 100 de celle du P.M. extracellulaire. Celle des autres composés est exprimée en p. 100 de la radioactivité du P.M. intracellulaire. La pénétration du [$^{14}C_6$]glucose est exprimée par $\frac{\text{coups/min/100 mg tissu}}{\text{coups/min/100 mg milieu extracellulaire}} \times 100$

Les résultats sont suivis de l'erreur standard sur la moyenne.

Nombre d'expériences avec [^{32}P]phosphate : n = 4,
avec [$^{14}C_6$]glucose : n = 3.

(*) Analyse statistique.

1) Blocs casualisés.
ATP + PC (I) comparé à ATP + PC (II) : $p < 0{,}01$.
ATP + PC (III) comparé à ATP + PC (IV) : $p < 0{,}02$.

2) Analyse factorielle par blocs des effets combinés de la NEM et de l'insuline sur l'ATP.
Action de l'insuline : $p < 0{,}001$.
Action de la NEM : non significatif.
Interaction insuline/NEM : non significatif.

3) Pénétration du [$^{14}C_6$]glucose. Analyse de la variance.
Entre (I) et (II) : $p < 0{,}01$.
Entre (III) et (IV) : non significatif.

un même diaphragme l'action de l'insuline sur la pénétration de glucose radioactif et sur l'incorporation de phosphate radioactif dans les nucléotides. Le Tableau VI indique que dans ces conditions ces deux actions insuliniques peuvent être séparées, la première étant pratiquement abolie alors que la seconde est conservée intégralement.

TABLEAU VI.

Action de la NEM et de l'insuline sur l'incorporation simultanée de [$^{14}C_6$]glucose dans le diaphragme et de [^{32}P]phosphate dans la phosphocréatine et les nucléotides du diaphragme.

Insuline : 10 µg/ml.....	0	+	0	+	0	+	0	+
NEM : 10^{-3} × M	0	0	+	+	0	0	+	+
	µg P/100 mg poids frais				Radioactivité spécifique			
P. M. i.....	30,7	31,8	35,1	33,8	4,7	4,8	4,5	4,8
P. C.	20,7	21,4	18,9	17,3	31	45	33	50
ATP.....	41	26,8	29,7	22,1	40	60	36	56
ADP	7,7	5,0	6,2	4,9	16	28	20	21
U + G.....	2,8	3,0	2,9	2,2	19	42	22	34
					Pénétration du [$^{14}C_6$] glucose			
					43	66	34	39

Le milieu d'incubation contient du glucose (2 mg/ml).

Durée de la préincubation en présence de NEM : 80 secondes.

L'incubation a duré 20 minutes : 10 min en présence de [$^{14}C_6$]glucose et 10 minutes en présence de [$^{14}C_3$]glucose + [^{32}P]phosphate. La radioactivité spécifique du PM intracellulaire est exprimée en p. 100 de celle du PM extracellulaire. Celle des autres composés est exprimée en p. 100 de la radioactivité spécifique du PM intracellulaire.

La pénétration du [$^{14}C_6$] glucose est exprimée par

$$\frac{\text{coups/min/100 mg tissu}}{\text{coups/min/100 mg milieu extracellulaire}} \times 100$$

P.M.i : phosphate minéral intracellulaire ; P.C. : phosphocréatine ; U + G : somme des nucléotides uridyliques et guanyliques.

DISCUSSION.

Suivant l'hypothèse qui a servi de point de départ au présent travail [18-20] les effets de l'insuline sur le métabolisme seraient une conséquence d'une réaction primaire entre l'hormone et un récepteur de la membrane, par un échange disulfure-sulfhydrile entre un pont S-S de l'insuline et un groupement -SH d'une protéine membranaire. La vérification de cette hypothèse exigerait que la suppression de l'interaction entre l'insuline et le récepteur cellulaire au moyen de réactifs des groupes sulfhydriles aboutit à la disparition de toutes les actions insuliniques observées sur le muscle en survie.

Il a été trouvé d'une façon constante que les réactifs des groupes -SH inhibaient l'accroissement du transport des sucres sous l'action de l'insu-

line [18, 19, 26]. L'action de cette hormone sur la biosynthèse du glycogène serait également inhibée [20], ainsi que la pénétration d'un acide aminé non métabolisable, l'acide α-aminoisobutyrique [20]. Cependant, la possibilité d'agir sélectivement par la NEM sur certaines des actions de l'insuline, sans inhiber d'autres phénomènes métaboliques stimulés par cette hormone dans le même tissu, n'a jamais été examinée systématiquement. Le but du présent travail est précisément d'étudier sur trois paramètres distincts de l'action insulinique la simultanéité ou la sélectivité de l'action inhibitrice de la NEM.

1. Il apparaît, en accord avec des travaux antérieurs [18, 19] que la stimulation par l'insuline du système de transport de certains sucres est extrêmement sensible à la NEM. Le fait que cette action de la NEM s'exerce indifféremment sur le système de transport du glucose et sur celui du galactose — qui selon Battaglia et Randle [26] sont distincts — indiquerait soit que ces deux systèmes de transport dépendent d'un mécanisme d'activation commun, soit qu'ils présentent certaines analogies de structure, et notamment un ou plusieurs groupes -SH nécessaires à leur activation. Une discussion détaillée de ce problème a été publiée récemment par Morgan *et al.* [27] à propos du transport de glucose dans le muscle cardiaque et les érythrocytes, et ne sera donc pas reprise ici. La signification de la présence dans le tissu musculaire d'un système de transport spécifique pour le galactose, que ce tissu ne peut pas utiliser comme substrat, resterait à établir.

2. Les résultats expérimentaux concernant la biosynthèse du glycogène, présentés dans le Tableau II, paraissent en contradiction avec ceux de Carlin et Hechter [20] qui ont constaté une inhibition presque complète de ce phénomène sous l'action de la NEM. Mais, outre le fait qu'au cours du travail en question les temps de préincubation des diaphragmes avec la NEM ont été plus longs que les nôtres, l'expression des résultats obtenus par ces auteurs ne pouvait pas leur permettre une évaluation correcte de l'action de l'insuline sur cette biosynthèse, puisque la quantité de glycogène synthétisé est indiquée en valeur absolue sans tenir compte de la quantité de glucose qui a pénétré dans la cellule et qui précisément est diminuée par la NEM. Dans le présent travail, au contraire, la stimulation spécifique de la biosynthèse du glycogène par l'insuline [28] est conservée même après une préincubation avec la NEM, et apparaît nettement lorsque cette action est évaluée en rapportant la quantité de glycogène synthétisé à la quantité de glucose qui a effectivement pénétré dans le tissu. L'évaluation directe de l'interconversion glycogène synthétase D $\rightleftharpoons$ glycogène synthétase I (Tableau III), confirme cette interprétation puisque l'activité de l'enzyme I en présence d'insuline est identique, que le tissu ait été ou non préincubé avec la NEM.

3. Il apparaît enfin que l'action de l'insuline sur l'incorporation de phosphate minéral dans les nucléotides et la phosphocréatine peut être aussi intégralement conservée lorsque la stimulation du transport des sucres par l'insuline est presque entièrement supprimée par la NEM.

Cette possibilité de séparer l'action de l'insuline sur le transport des sucres de son action sur l'incorporation de phosphate dans les nucléotides ne peut être cependant mise en évidence que lorsque les temps de préincubation du tissu avec l'inhibiteur sont courts et que la concentration de ce dernier n'excède pas 10^{-3} × M. Dans le cas contraire, l'action inhibitrice de la NEM semble s'exercer sur toute une série de réactions du métabolisme et aboutit rapidement à un effondrement de la teneur du tissu en nucléotides et en phosphocréatine (Tableau IV), ce qui ne permet plus d'interpréter l'action de cet inhibiteur comme s'exerçant spécifiquement vis-à-vis des seuls effets de l'insuline.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible d'inhiber sélectivement l'action de l'insuline sur le transport des sucres au moyen d'un inhibiteur des grouppes -SH en contrôlant soigneusement le temps de préincubation et la concentration de l'inhibiteur.

La première conclusion que l'on peut ainsi tirer de ces expériences est qu'un ou plusieurs groupes -SH, probablement situés dans la membrane cellulaire, sont effectivement nécessaires à l'activation du système transporteur sous l'action de l'insuline. Cette conclusion est en accord avec de nombreuses publications précédentes mais ne signifie nullement que l'on soit en présence d'une réaction d'échange disulfure-sulfhydrile entre l'insuline et le système transporteur en question. D'autres hypothèses sur le rôle des groupes -SH dans cette activation ont été proposées par Morgan *et al.* [27]. L'un des principaux arguments proposés en faveur d'une réaction d'échange thiol-disulfure pour des hormones comprenant un pont disulfure, telles que l'insuline, l'ocytocine et la vasopressine était que l'intégrité de ce pont disulfure paraît nécessaire à leur activité biologique [29, 30]. Mais cet argument a perdu sa valeur depuis les travaux récents de Rudinger *et al.* [31] sur l'ocytocine : en effet la synthèse d'un analogue *actif* de cette hormone, dans lequel le pont disulfure est remplacé par un pont — S — CH_2 — indique que le pont disulfure n'est pas impliqué dans une réaction d'échange avec un groupe thiol du récepteur cellulaire.

Cette conclusion n'exclut pas la possibilité d'une interaction d'un autre type entre l'insuline et la membrane cellulaire. Des travaux récents envisagent la possibilité d'une action de l'insuline sur la structure lipoprotéique de la membrane soit par protéolyse limitée [32, 33], soit par une action directe sur les phospholipides [34, 35]. Il apparaît que des expériences effectuées à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des groupes —SH, comme le sont celles rapportées ici, peuvent ne pas mettre en évidence de telles interactions.

Il est en outre possible de conclure que l'activation du système de transport des sucres et l'activation de la glycogène synthétase par l'insuline sont deux phénomènes indépendants, ou du moins que la stimulation de la biosynthèse du glycogène est indépendante de la quantité de glucose qui pénètre dans la cellule. Cette dernière conclusion apparaissait déjà dans certains travaux antérieurs au cours desquels la pénétration accrue de glucose était provoquée soit par augmentation de la concentration

extracellulaire du glucose, soit par l'insuline [28, 36, 37]. Cette conclusion se trouve ici pour la première fois confirmée par une méthode expérimentale directe.

Enfin, l'action de l'insuline sur la vitesse de renouvellement des nucléotides et de la phosphocréatine est elle aussi indépendante de son action sur le transport du glucose. Ce fait ne signifie cependant pas nécessairement que les deux phénomènes ne soient pas liés comme cela a été envisagé récemment par E. Cabib [38]. La stimulation du système transporteur du glucose par phosphorylation ou déphosphorylation réversible d'une protéine aux dépens de l'ATP a été postulée, il y a déjà quelque temps, par Randle et Smith [39]. Le mécanisme proposé par ces auteurs (phosphorylation inactivante du transporteur en absence d'insuline) ne s'accorde cependant pas avec un renouvellement accéléré du phosphate terminal de l'ATP tel qu'il est mis en évidence ici et dans des travaux précédents [23, 40]. Au contraire, si l'activation du système de transport dépendait de l'ADP, il serait possible de proposer une explication commune à tous les phénomènes de stimulation de ce transport qui ont été mis en évidence jusqu'à présent : stimulation par l'anoxie [27, 39], le travail musculaire [27, 41], l'insuline. Dans ce dernier cas, le renouvellement accru du phosphate terminal de l'ATP pourrait être expliqué par une stimulation de la déphosphorylation de ce nucléotide sous l'action d'un système ATPasique localisé à proximité du transporteur de la membrane ; c'est l'ADP libéré qui agirait sur ce transporteur pour provoquer une entrée accrue du glucose.

Nous remercions le Docteur F. Meyer de ses conseils qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Nous remercions également M^lle M. Bourdain pour sa collaboration technique.

L'acquisition des substrats radioactifs a été possible grâce à une subvention partielle n° 05952 du 6 octobre 1965 accordée par le C.E.A. (Saclay — France).

Summary.

1) Selective inhibition of various insulin actions has been studied on the isolated rat diaphragm after short-time preincubation of the muscle with N-Ethylmaleïmide (NEM $10^{-3} \times$ M). Under these conditions it proves possible to suppress specifically the action of insulin on glucose and galactose transport.

2) Despite this inhibition, it remains possible to observe an insulin-induced stimulation of glycogen biosynthesis ; moreover the conversion of glycogen synthetase D to glycogen synthetase I under the influence of the hormone is not modified by the inhibitor.

3) The incorporation of ^{32}P inorganic phosphate into free mononucleotides and phosphocreatine and its stimulation by insulin are not inhibited by short preincubations of the diaphragms with NEM.

4) It is concluded that the insulin-induced stimulation of sugar transport through the cell membrane is not a prerequisite for the action of this hormone on other metabolic phenomena. The hypothesis of a primary exchange reaction between a disulfide bridge of the hormone and a free thiol group of the « cellular receptor » is equally discussed.

Zusammenfassung.

1) Die Möglichkeit, verschiedene Wirkungen des Insulins auf das isolierte Rattenzwerchfell selektiv zu inhibieren wurde an Hand von kurzen Präinkubationsexperimenten mit N-Ethylmaleimid (NEM 10^{-3} M) studiert. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, die Insulinwirkung auf den Glukose und Galaktosetransport spezifisch zu hemmen.

2) Trotz dieser Hemmung kann man eine Insulinwirkung auf die Glykogenbiosynthese weiter beobachten ; auch die Uberführung der Glykogensynthetase von der Form D zur Form I bleibt unverändert.

3) Der Einbau anorganischen ^{32}P-Phosphats in die freien Mononukleotide und das Phosphokreatin wird durch eine kurze Präinkubation mit NEM nicht gehemmt. Die Beschleunigung dieses Einbaus durch Insulin bleibt unter diesen Bedingungen ebenfalls erhalten.

4) Es wird geschlossen dass die durch Insulin ausgelöste Stimulierung des Zuckertransports durch die Zellmembran die anderen Wirkungen dieses Hormons auf den Metabolismus nicht bedingt. Andererseits wird die Hypothese einer Primarreaktion zwichen einer Disulfidrücke des Insulins und einer Thiolgruppe des Zellrezeptors an Hand dieser Ergebnisse besprochen.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Clauser, H., Volfin, P., Eboue-Bonis, D. et Chambaut, A. M. — Conf. VII giornate Biochimiche latine, S. Margherita Ligure, 23-26 Maggio 1963, p. 187.
2. Clauser, H., Chambaut, A. M., Eboue-Bonis, D. et Volfin, P. — *Annales d'Endocrinologie*, 1965, **26**, n° 5 bis, supp., p. 714.
3. Kipnis, D. M. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959, **82**, 354.
4. Kipnis, D. M. et Cori, C. F. — *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 171.
5. Morgan, H. E., Regen, D. M. et Park, C. E. — *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 369.
6. Crofford, O. B. et Renold, A. E. — *J. Biol. Chem.*, 1965, **240**, 3237.
7. Kipnis, D. M. et Noall, M. W. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **28**, 226.
8. Manchester, K. L. et Young, F. G. — *Biochem. J.*, 1960, **75**, 487.
9. Wool, I. G. — *Federation Proc.*, 1965, **24**, 1060.
10. Sacks, J., dans W. D. McElroy et B. Glass, « Phosphorus metabolism » II Symposium, Baltimore, Johns Hopkins Univ. Mc Collum Pratt Inst. Contrib., 1952, p. 653.
11. Kaji, H. et Park, C. R. — *Federation Proc.*, 1961, **20**, 190.
12. Zierler, K. L. — *Am. J. Physiol.*, 1960, **198**, 1066.
13. Wool, I. G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **68**, 28.
14. Eboue-Bonis, D., Chambaut, A. M., Volfin, P. et Clauser, H. — *Nature*, 1963, **199**, 1183.
15. Wool, I. G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **91**, 248.
16. Carlin, H. et Hechter, O. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1964, **115**, 127.
17. Sovik, O. et Walaas, O. — *Nature*, 1964, **202**, 396.
18. Cadenas, E., Kaji, H., Park, C. R. et Rasmussen, H. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, P.C. 64.
19. Mirsky, I. A. et Perisutti, G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, **62**, 490.
20. Carlin, H. et Hechter, O. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, P.C. 1371.
21. Somogyi, M. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **160**, 61.
22. Villar-Palasi, C. et Larner, J. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **94**, 436.
23. Clauser, H., Volfin, P. et Eboue-Bonis, D. — *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1962, **2**, 369.
24. Volfin, P., Clauser, H., Gautheron, D. et Eboue, D. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, **43**, 107.
25. Volfin, P., Clauser, H. et Eboue, D. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, **44**, 205.
26. Battaglia, F. C. et Randle, P. J. — *Biochem. J.*, 1960, **75**, 408.
27. Morgan, H. E., Neely, J. R., Wood, R. E., Liebecq, C., Liebermeister, H. et Park, C. R. — *Federation Proc.*, 1965, **24**, 1040.
28. Beloff-Chain, A., Catanzaro, R., Chain, E. B., Masi, I., Pocchiari, F. et Rossi, C. — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1955, **143** 481.

29. Audrain, L. et Clauser, H. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **38**, 494.
30. Volfin, P., Chambaut, A. M., Eboue-Bonis, D., Clauser, H., Brinkhoff, O. Bremer, H., Meienhofer, J. et Zahn H. — *Nature*, 1964, **203**, 408.
31. Rudinger, J. et Jost, K. — *Experientia*, 1964, **XX**, 570.
32. Rieser, P. et Rieser, C. H. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, **105**, 20.
33. Rieser, P. et Rieser, C. H. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1964, **116**, 669.
34. Rodbell, M. — *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 130.
35. Rodbell, M. et Jones, A. B. — *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 140.
36. Norman, D., Menozzi, P., Reid, D., Lester, G. et Hechter, O. — *J. Gen. Physiol.*, 1959, **42**, 1277.
37. Larner, J., Villar-Palasi, C. et Richman, D. J. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959, **82**, 845.
38. Cabib, E. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1963, **32**, 321.
39. Randle, P. J. et Smith, G. H. — *Biochem. J.*, 1958, **70**, 490 et 501.
40. Volfin, P., Eboue, D. et Clauser, H. — *Nature*, 1961, **192**, 166.
41. Helmreich, E. et Cori, C. F. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **224**, 663.
42. Chambaut, A. M. — Thèse de Doctorat de 3e Cycle, Orsay, 1965.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.